

39/1147 I
PCT/EP 00 / U 1 / / 4
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 28 APR 2000

WIPO

PCT



Bescheinigung

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Die Merck Patent GmbH in Darmstadt/Deutschland hat eine Patentanmeldung
unter der Bezeichnung

"Histidin Protein-Phosphatase"

am 4. März 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole
C 07 K und A 61 K der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 18. Oktober 1999

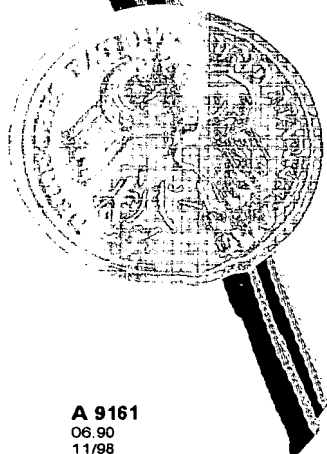
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 09 388.1

Jerofsky



A 9161

06.90
11/98

EDV-1

B3-~~mus~~ 88010



**Merck Patent Gesellschaft
mit beschränkter Haftung
64271 Darmstadt**

Histidin Protein-Phosphatase

HISTIDIN PROTEIN-PHOSPHATASE

Die Erfindung betrifft eine neue Histidin Protein-Phosphatase humanen Ursprungs und vom Kaninchen, eine dieses Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung einer solchen.

Histidin-Phosphatasen und Histidin-Kinasen sind Enzyme, die entgegengesetzt wirken. Histidin-Kinase bewirkt die Phosphorylierung bestimmter Histidin-Reste in Proteinen, während Histidin-Phosphatasen diese Phosphorylierung wieder rückgängig machen. Beide Enzyme spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, der Apoptose, der Kontrolle des Zellwachstums und in der Zelldifferenzierung. Es sind Erkrankungen bekannt, die auf Störungen dieser Zellfunktionen beruhen. Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem pathophysiologische Störungen in ihrer Ursache untersucht und gegebenenfalls therapiert werden können.

Hormone oder Peptide stimulieren Zelloberflächen-Rezeptoren einer Zelle und lösen zelluläre Effekte über einen Signal-Transduktionsweg aus. Für die intrazelluläre Signalübertragung spielt die reversible Phosphorylierung von spezifischen Protein-Substraten durch regulatorische Protein-Kinasen und Phosphatasen eine wesentliche Rolle. Rezeptor-gebundene, membran-gebundene und intrazelluläre Protein-Kinasen und Phosphatasen regulieren Vorgänge der Zell-Proliferation, der Zell-Differenzierung und des Immunsystems. Eine Fehlfunktion dieser Regulatoren oder derer Aktivitäten ist ausschlaggebend für eine Vielzahl an pathophysiologischen Effekten. Dementsprechend stellen die Protein-Kinasen und Phosphatasen und der Signaltransduktionsweg, an dem sie beteiligt sind, potentielle Targets dar für den Drug Discovery Process.

In Mammalia erfolgt die Signaltransduktion in der reversible Phosphorylierung von Ser/Thr/Tyr. Das Vorhandensein von Histidin-Phosphat ist im Säuger zwar bekannt aber weder die entsprechenden Kinasen noch die dazugehörigen Phosphatasen konnten bislang identifiziert werden. Die Schwierigkeit liegt u.a. darin,

dass Histidin-Phosphat hydrolytisch instabil ist und bei einer standardmässigen Phosphoaminosäurenanalyse nicht detektiert wird.

Die Funktionen von His-Kinasen und His-Phosphatasen sind in Bakterien sehr gut untersucht. Ihre Beteiligung bei Chemotaxis und Adaption macht sie zu aus-

5 sichtsreichen Angriffspunkten bei bakteriellen Erkrankungen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Protein mit der biologischen Aktivität einer Histidin-Phosphatase, beschrieben mit der Nukleotidsequenz in

10 Tab. 1 und der Aminosäuresequenz in Tab.2. Die Erfindung umfaßt ebenfalls entsprechende Varianten und Mutanten, beispielsweise erzeugt durch zufällige oder gesteuerte Substitution, Deletion oder Addition von einer oder mehrerer Nukleotide oder Aminosäuren, wobei die biologische Aktivität im wesentlichen erhalten bleibt.

15

Im folgenden wird die Erfindung im einzelnen beschrieben.

(A) GEWINNUNG UND AUFREINIGUNG

Die Histidin Protein-Phosphatase wurde aus Kaninchenleber isoliert.

Die Präparation der Leber geht von ca 110 g Material geschnitten in kleine Stük-

20 ke aus. Es wird mit Homogenisationspuffer (220 ml 30 mM Triethanolamin/Salzsäure pH7.5, 1mM Ethylendiamintetraessigsäure, 300 mM Saccharose, 0.1 mM Benzamidin, 0.1% 2-Mercaptoethanol) versetzt und mit einem Homogenisator unter Eiskühlung zerkleinert. Einer ersten Zentrifugation (10 min bei 3800 g, 4°C) wird der Überstand rezentrifugiert (1 h bei 48000 g, 4°C). Dieser Über-

25 stand wird durch Mull filtriert und in Aliquots von ca. 20 ml bei -80°C eingefroren.

Säulenchromatographische Trennverfahren

Die Histidin-Phosphatase wurde über drei Reinigungsschritte isoliert.

1. Anionenaustausch-Chromatographie

30 Der Leberrohextrakt wird noch einmal zentrifugiert (30 min bei 48000 g). Der Überstand wird auf eine Source Q30 (Pharmacia, Freiburg) equilibriert mit Puffer A (20 mM Triethanolamin/Salzsäure pH8.0, 1mM Ethylendiamintetraessigsäure, 0.1% 2-Mercaptoethanol, 0.02% Natriumnitrit) aufgetragen. Die Elution erfolgt mit 200 mM Natriumchlorid in Puffer A bei einer Flussrate von 1 ml/min.

2. Gelfiltration

Die aktive Fraktion (siehe Aktivitätsbestimmung) wird unter Rühren und Kühlen mit festem Ammoniumsulfat versetzt (11,2 g auf 17 ml). Das Pellet wird abzentrifugiert (20 min bei 48000 g, 4°C), in Puffer A resuspendiert und auf eine Superdex 75 26/60 1,6x60 cm (Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Die Gelfiltration erfolgt unter dem Zusatz von 50 mM Natriumchlorid zu Puffer A bei 1 ml/min.

3. Affinitätschromatographie

Die aktive Fraktion der Gelfiltration wird mit Puffer B (20 mM Triethanolamin / Salzsäure pH8.0, 0,1mM Ethylendiamintetraessigsäure, 0.1% 2-Mercaptoethanol, 0.02% Natriumnitrit) im Verhältnis 1:3 verdünnt und auf 10 mM Magnesiumchlorid eingestellt. Die Probe wird auf eine Blue Sepharose 6 25x510 mm (Pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Die Elution erfolgt mittels Puffer B, der 200 mM Natriumchlorid enthält bei einer Flussrate von 1 ml/min.

15 (B) NACHWEIS DER SPEZIFISCHEN AKTIVITÄT

Die Aktivität der löslichen Histidin-Phosphatase wird über die Dephosphorylierung von ³²P-markiertem Histidin-phosphoryliertem Protein (CheA) als Substrat bestimmt. CheA ist eine rekombinante bakterielle Histidin-Autokinase; die C-terminale Kinasedomäne phosphoryliert das N-terminale His48.

20 Freies Phosphat als Reaktionsprodukt wurde über Dünnschicht-Chromatographie identifiziert (Polyethylenimin-Celluloseplatten, 0.5 M Lithiumchlorid als Fließmittel). Detektion einerseits via Ammoniummolybdat, andererseits per Autoradiografie. Ein Phosphattransfer auf andere Proteine war nicht gegeben, ebenso wenig wie eine Spaltung des Substrates in Peptidfragmente. Das Produkt ist Phosphat, d.h. es handelt sich um eine Phospho-histidin Protein-Phosphatase.

Das gereinigte Protein zeigt Zeit-, Temperatur-, pH- und Protein-abhängige Histidin-Dephosphorylierung von dem ³²P-phosphoryliertem CheA.

30 Stabilität:

Lagerungsstabil im Rohhomogenat und in den teilgereinigten Fraktionen.

Enzymtest

Substratvorbereitung: (^{32}P -Markierung von CheA)

Rekombinantes CheA (5 μl) werden mit 0,5 μl 100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid in Dimethylsulfoxid und 5 μl 500 mM HEPES pH8.0, 1 mM Magnesiumchlorid versetzt. Nach der Zugabe von 108 μCurie ^{32}P -g-Adenosintriphosphat, 5 μl 10 μM Adenosintriphosphat und 50 μl Wasser wird für 3 h bei 37°C inkubiert.

Aktivitätsbestimmung

Das Substrat (10 μl ^{32}P -CheaA) wird mit 10 μl Assaypuffer (100 mM Triethanolamin / Salzsäure pH8.0, 0.1% 2-Mercaptoethanol, 0.02% Natriumnitrit) und der Enzymlösung versetzt. Die Reaktion erfolgt in 30 min bei 37°C. Dann wird 2 μl 500 mM Ethylendiamintetraessigsäure und 126 μl Methanol/Aceton 1:1 hinzugegeben. Nach einer Zentrifugation (5 min bei 15800 g) wird der Überstand entnommen und im Szintillationsmessgerät vermessen.

15

Somit grenzt sich die beschriebene Phosphatase gegenüber anderen Protein-Phosphatasen ab aufgrund

- 1) der Spezifität für Phosphohistidin;
- 2) Nicht-Hemmbarkeit der Aktivität durch Okadainsäure;
- 20 3) des wesentlich kleineren Molekulargewichts.

(C) CHARAKTERISIERUNG DER HISTIDIN PROTEIN-PHOSPHATASE

Die gereinigte Proteinfraction enthielt eine definierte Bande mit einem apparenten Molekulargewicht bei 14 kDa nach der Analyse mit SDS-Gelelektrophorese (Abbildung 1).

25

(D) PROTEINANALYTISCHE BESTIMMUNG

Die aktive Fraktion (Abb.1) wurde zur Bestimmung der Aminosäuresequenz enzymatisch gespalten und die resultierenden Peptidfragmente wurden mittels Edman Abbau und Massenspektrometrie sequenziert.

30

Enzymatische Fragmentierung

Die Gelbande wurde mithilfe eines Skalpells ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die enzymatische Fragmentierung erfolgte nach der Zu-

gabe von Trypsin als Protease (1 µg Trypsin, 100 µl 0.05 M Ammoniumhydrogencarbonat, 37°C, 12 h). Die resultierenden Peptidfragmente wurden extrahiert (50 % Trifluoressigsäure, 50% Acetonitril). Der Extrakt wurde in der Vakuumzentrifuge eingeeengt.

5

Chromatographische Trennung der Peptidfragmente

Die Peptidfragmente wurden in Laufmittel A (0.1% Trifluoressigsäure in Wasser) gelöst und zur Trennung mittels reversed-phase Chromatographie appliziert (Laufmittel B: 20% 0.1% Trifluoressigsäure in Wasser, 80% Acetonitril). Nach der
10 Fraktionierung gemäss der UV-Detektion bei 214 nm lagen die separierten Peptidfragmente gelöst vor und wurden mittels Edman-Sequenzierung und Massenspektrometrie bestimmt.

Edman-Sequenzierung und Massenspektrometrische Bestimmungen

15 Die flüssigen Fraktionen nach der chromatographischen Trennung wurden zu 90 % zur Edman-Sequenzierung eingesetzt (Standardbedingungen, Gerät: Model 494, PE-Applied Biosystems, Weiterstadt). Der restliche Teil der Fraktion wurde für eine Massenanalyse eingesetzt (MALDI-MS, Gerät: Voyager STR, Perseptive Biosystems, Wiesbaden).

20

Identifizierte Peptidsequenzen

Die folgenden Peptidsequenzen wurden bestimmt:

AVAALAQIPD VDIDSDGVFK

YVLIR

25 VHAAPPSEAPTGESK

DIVR

WAEYHADIYDK

VSGELEK

ISH QSQDK

30 KIHVY GYSMGYGR

YPDYEVTWA DDGY

Datenbankanalyse

Mit den erhaltenen Peptidsequenzen wurde eine Datenbanksuche durchgeführt. Gesucht wurde mit der ATG-Software in der HGS-Datenbank, wobei sowohl Protein- als Nukleotid-Sequenzen gegengesucht wurden. Es konnte keine Übereinstimmung mit einem Protein-Eintrag gefunden werden. Eine Übereinstimmung für alle analysierten Peptidsequenzen konnte jedoch mit dem HGS-Assembly 12780078 gefunden werden.

12780078 Length: 1263 March 3, 1999 11:10 Type: N Check: 2837 ..

10

15

20

25

30

35

```
1  CTTGAATGTA GCGGCTGCCG TTGCCTCCTT GTACCGGTAG CGGGGTGGG
51 GACGGAAGCC TTCGGTCGGT GGAGAGGAGA AAGGGAGAGG CCTTCGGGCG
101 GTGGACGGGG AAGAGAGGGA GTCCTTCGGG CGGTGGAGGG GGTGGAGAGA
151 AAGCGGGGAN GGGGGAGGNC TTCGGGCGGT GGNANGGGCA CAGGAGGGAG
201 GCCTTTGGGC GGTGGGGGCC ACGGGGAGGG TGGTCTTCGG ACTACGTGCG
251 GGACAGGAGG TCAGGGCTGG CAAGTCCCTC AGGCCTCCCT CGTTGCCCCA
301 GCCTCGCGGG CCGCCTAACT GCCCGTTCC AAGGGTGCCA CCGGACCCCCG
351 CTGGAGAGGA ACTTCTCCGT TGGCTGGATT TCATCACCAC CCATTCCCGA
401 TTCCACGTTT CCTTTAAGCG GGGCTGGCGG AGCCGCAAGG CGGCAAGGAA
451 CTGGATTGCG ATTGGTCAGC ACGTGCCTCG GTCGGCGGTA CAATTGGCTG
501 AGGCGCTGGG CCTTGGAAG CATTCCCCGA CGGGATTGGT CGTCGCTCTC
551 GCAGAGCCCG CCTCCCGCAG TACAAGCGGC CCCCGGGTCG GGTGGGAGGA
601 GGGGACTCCG GGAGGAGGAA CATGGCGGTG GCGGACCTCG CTCTCATTCC
651 TGATGTGGAC ATCGACTCCG ACGGCGTCTT CAAGTATGTG CTGATCCGAG
701 TCCACTCGGC TCCCCGCTCC GGGGCTCCGG CTGCAGAGAG CAAGGAGATC
751 GTGCGCGGCT ACAAGTGGGC TGAGTACCAT GCGGACATCT ACGACAAAGT
801 GTCGGGCGAC ATGCAGAAGC AAGGCTGCGA CTGTGAGTGT CTGGGCGGCG
851 GGC GCATCTC CCACCAGAGT CAGGACAAGA AGATTCACGT GTACGGCTAT
901 TCCATGGCCT ATGGTCCTGC CCAGCACGCC ATTTCAACTG AGAAAATCAA
951 AGCCAAGTAC CCCGACTACG AGGTCACCTG GGCTAACGAC GGCTACTGAG
1001 CACTCCCAGC CCGGGGCCTG CTGCCTCCAG CAGCCACTTC AGAGCCCCCG
1051 CCTTTGCCTG CACTCCTCTT CAGGGCTGGC CCTGCCTGCT CCTGCGGCAG
1101 CCTCTGGTGA CGTGCTGTCC ACCAGGCCTT GGAGACAGGC TAGCCTGGCC
1151 ACAGAATTAA ACGTGTTGCC ACCACCAAAA AAANAAAAAA AAAAAAATTT
1201 CGGGGGGGGG NCCCGTTNCC CATTTGGCCC TTTAGGGGTG GTTTTAAATT
1251 NATTGGGCTG GTT
```


Tab 1. Die Protein-codierende Sequenz der Histidin-Phosphatase ist **fett** markiert.

5 (E) PROTEINCHARAKTERISIERUNG

Die sequenzierten Peptidfragmente stimmen mit der translatierbaren Proteinsequenz des HGS-Assemblies 12780078 (humane Sequenz) wie folgt überein:

10

```

M AVADLALIPD VDIDSDGVFK YVLIRVHSAP RSGAPAAESK EIVRGYKWAE
1 x AVAALAQIPD VDIDSDGVFK YVLIRVHAAP PSEAPTGESK DIVRGYKWAE

YHADIYDKVS GDMQKQG CDC ECLGGGRISH QSQDKKIHVY GYSMAYGPAQ
15 51 YHADIYDKVS GELEKQG CDC ECLGGGRISH QSQDKKIHVY GYSMGYRAQ

HAISTEKIKA KYPDYEVTWA NDGY
101 HAISTEKIKA KYPDYEVTWA DDGY

```

20

Anmerkung: x: N-terminal blockierende Gruppe.

OberZeile: humane Sequenz (HGS Assembly 12780078, Position 622-996)

Untere Zeile: Kaninchen (Leber) fett: sequenziert, kursiv-unterstrichen: AA-Austausch

25

Tab. 2: Aminosäuresequenz der Histidin Protein-Phosphatase.

Somit können folgende Charakteristiken für die Histidin Protein-Phosphatase zusammengefasst werden:

30

1. Die Aminosäuresequenz der humanen Histidin Protein-Phosphatase enthält ca. 124 Aminosäuren gemäss der Sequenzpositionen 624-995 des HGS-Assembly 12780078.

2. Die Aminosäuresequenz des Proteins aus Kaninchen ist bis auf ca 14 Austausch homolog, dh ca 90% Homologie.

3. Das Molekulargewicht beträgt 13768 Da +/- 10 Da (Abbildung 3).

4. Die Histidin Protein-Phosphatase ist N-terminal blockiert. Dieses Molekülteil

5 besitzt eine Grösse von weniger als 100 Dalton.

1. Gewebeverteilung

Gemäss der Charakterisierung des Assembly 12780078 bezüglich der Probenherkunft, ist die ubiquitäre Verbreitung der Histidin Protein-Phosphatase abzuleiten:

10

Components for Assembly 12780078

| Assembly ID | Library Name |
|-------------|--|
| 12780078 | Human Pituitary, subt IX |
| 12780078 | Ulcerative Colitis |
| 15 12780078 | T cell helper II |
| 12780078 | Human endometrial stromal cells |
| 12780078 | Human endometrial stromal cells-treated with estradiol |
| 12780078 | Human Adult Pulmonary;re-excision |
| 12780078 | Dendritic cells, pooled |
| 20 12780078 | Human Bone Marrow, treated |
| 12780078 | Human Adult Testes, Large Inserts, Reexcision |
| 12780078 | Human Primary Breast Cancer Reexcision |
| 12780078 | Adipocytes |
| 12780078 | Macrophage (GM-CSF treated) |
| 25 12780078 | Synovial fibroblast (control) |
| 12780078 | Synovial hypoxia |
| 12780078 | Macrophage (GM-CSF treated) |
| 12780078 | Human Gastrocnemius |
| 12780078 | Colon Normal |
| 30 12780078 | Salivary Gland |
| 12780078 | Mo7e, treated |
| 12780078 | Adrenergic 7TMR |
| 12780078 | Stomach |
| 12780078 | NCI_CGAP_Lu5 |

| | | |
|----|----------|--|
| | 12780078 | NCI_CGAP_Brn23 |
| | 12780078 | NCI_CGAP_Brn25 |
| | 12780078 | Barstead prostate BPH HPLRB4 1 |
| | 12780078 | NCI_CGAP_Kid3 |
| 5 | 12780078 | NCI_CGAP_Kid5 |
| | 12780078 | NCI_CGAP_GC4 |
| | 12780078 | Barstead spleen HPLRB2 |
| | 12780078 | Infant Brain, Bento Soares |
| | 12780078 | Soares fetal liver spleen 1NFLS |
| 10 | 12780078 | Soares infant brain 1NIB |
| | 12780078 | 22 week old human fetal liver cDNA library |
| | 12780078 | Fetal heart, Lambda ZAP Express |
| | 12780078 | Soares breast 3NbHBst |
| | 12780078 | Soares melanocyte 2NbHM |
| 15 | 12780078 | Soares placenta 8 to 9 weeks 2NbHP8to9W |
| | 12780078 | Soares multiple sclerosis 2NbHMSP |
| | 12780078 | Soares fetal lung NbHL19W |
| | 12780078 | Soares parathyroid tumor NbHPA |
| | 12780078 | Soares senescent fibroblasts NbHSF |
| 20 | 12780078 | Soares fetal heart NbHH19W |
| | 12780078 | Soares pregnant uterus NbHPU |
| | 12780078 | Stratagene pancreas (#937208) |
| | 12780078 | Stratagene colon HT29 (#937221) |
| | 12780078 | Soares testis NHT |
| 25 | 12780078 | Soares total fetus Nb2HF8 9w |
| | 12780078 | HM3 |
| | 12780078 | NCI_CGAP_Co3 |
| | 12780078 | NCI_CGAP_Thy1 |
| | 12780078 | NCI_CGAP_Br2 |
| 30 | 12780078 | NCI_CGAP_Pr21 |
| | 12780078 | NCI_CGAP_Pr11 |
| | 12780078 | NCI_CGAP_Co11 |
| | 12780078 | NCI_CGAP_Co10 |
| | 12780078 | NCI_CGAP_Co9 |

| | | |
|----|----------|--|
| | 12780078 | Human Fetal Lung |
| | 12780078 | Human Fetal Lung III |
| | 12780078 | Human Pituitary |
| | 12780078 | Human Fetal Heart |
| 5 | 12780078 | Human Cerebellum |
| | 12780078 | Human Colon |
| | 12780078 | Human Thymus |
| | 12780078 | Human Rhabdomyosarcoma |
| | 12780078 | Nine Week Old Early Stage Human |
| 10 | 12780078 | 7 Week Old Early Stage Human, subtracted |
| | 12780078 | Human Epididymus |
| | 12780078 | Human Chondrosarcoma |
| | 12780078 | breast lymph node CDNA library |
| | 12780078 | Amniotic Cells - Primary Culture |
| 15 | 12780078 | Bone Marrow Cell Line (RS4;11) |
| | 12780078 | Fetal Liver, subtraction II |
| | 12780078 | CD34 depleted Buffy Coat (Cord Blood), re-excision |

Abbildungen:

- 20 Abb. 1: Analyse der Fraktion mit aktiver Histidin-Phosphatase (SDS-PAGE)
- Abb. 2: Chromatische Trennung der Histidin-Phosphatase nach enzymatischer Fragmentierung
- Abb. 3: Massenspektrum der Histidin-Phosphatase

25

Referenzen

Crovello, CS, Furie, BC, Furie, B (1995) Cell 82,279-286. Histidine phosphorylation of P-selectin upon stimulation of human platelets: a novel pathway for activation-dependent signal transduction.

Patentansprüche:

1. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer Histidin-Phosphatase, welche eine hohe Spezifität zu Phosphohistidin und eine Molekulargewicht von 13-14 kDa aufweist, erhältlich durch Aufreinigung von Kaninichenleber mittels Anionenaustauscherchromatografie, Gelfiltration und Affinitätschromatografie.
2. Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die folgende Aminosäuresequenz enthält:
AVAALAQIPD VDIDSDGVFK YVLIRVHAAP PSEAPTGESK DIVRGYKWAE
YHADIYDKVS GELEKQG CDC ECLGGGRISH QSQDKKIHVY GYSMGYGRAQ
HAISTEKIKA KYPDYEVTWA DDGY
3. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer humanen Histidin-Phosphatase, welche eine hohe Spezifität zu Phosphohistidin, ein Molekulargewicht von 13-14 kDa und eine 88 – 92% ige Homologie zu der Sequenz gemäß Anspruch 2 aufweist.
4. Polypeptid nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die folgende Aminosäuresequenz enthält:
M AVADLALIPD VDIDSDGVFK YVLIRVHSAP RSGAPAAESK EIVRGYKWAE
YHADIYDKVS GDMQKQG CDC ECLGGGRISH QSQDKKIHVY GYSMAYGPAQ
HAISTEKIKA KYPDYEVTWA NDGY
5. DNA codierend für ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer humanen Histidin-Phosphatase enthaltend die Nucleotidsequenz:
ATGGCGGTG GCGGACCTCG CTCTCATTCC TGATGTGGAC ATCGACTCCG
ACGGCGTCTT CAAGTATGTG CTGATCCGAG TCCACTCGGC TCCCCGCTCC
GGGGCTCCGG CTGCAGAGAG CAAGGAGATC GTGCGCGGCT ACAAGTGGGC
TGAGTACCAT GCGGACATCT ACGACAAAGT GTCGGGCGAC ATGCAGAAGC
AAGGCTGCGA CTGTGAGTGT CTGGGCGGCG GGCGCATCTC CCACCAGAGT
CAGGACAAGA AGATTCACGT GTACGGCTAT TCCATGGCCT ATGGTCCTGC
CCAGCACGCC ATTTCAACTG AGAAAATCAA AGCCAAGTAC CCCGACTACG
AGGTCACCTG GGCTAACGAC GGCTAC

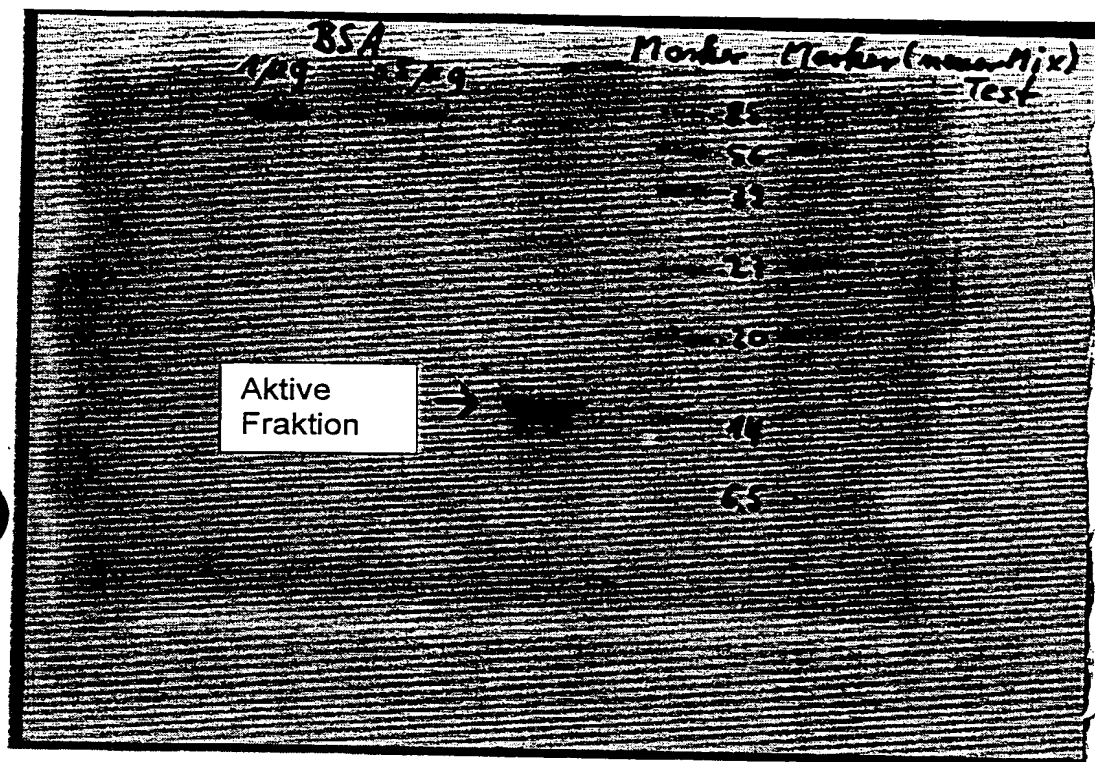
6. Arzneimittel, dadurch gekennzeichnet, daß es ein Polypeptid gemäß der Ansprüche 1 – 4 ist.
- 5 7. Pharmazeutische Zubereitung, enthaltend ein Arzneimittel nach Anspruch 6, ggf. zusammen mit geeigneten Hilfs-, Träger- und anderen Wirkstoffen.
- 10 8. Monoklonaler Antikörper, gerichtet auf ein Polpeptid gemäß der Ansprüche 1 – 4.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Erfindung betrifft eine neue Histidin Protein-Phosphatase humanen Ursprungs und vom Kaninchen, eine dieses Protein kodierende DNA sowie ein
5 Verfahren zur Herstellung einer solchen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper. Die neue Phosphatase kann für pathologische Zustände der Zellregulierung und des Zellwachstums Verwendung finden.

10

15



SDS-PAGE
kol. Coomassie

Abbildung 1. Analyse der Histidin-Phosphatase aktiven Fraktion.

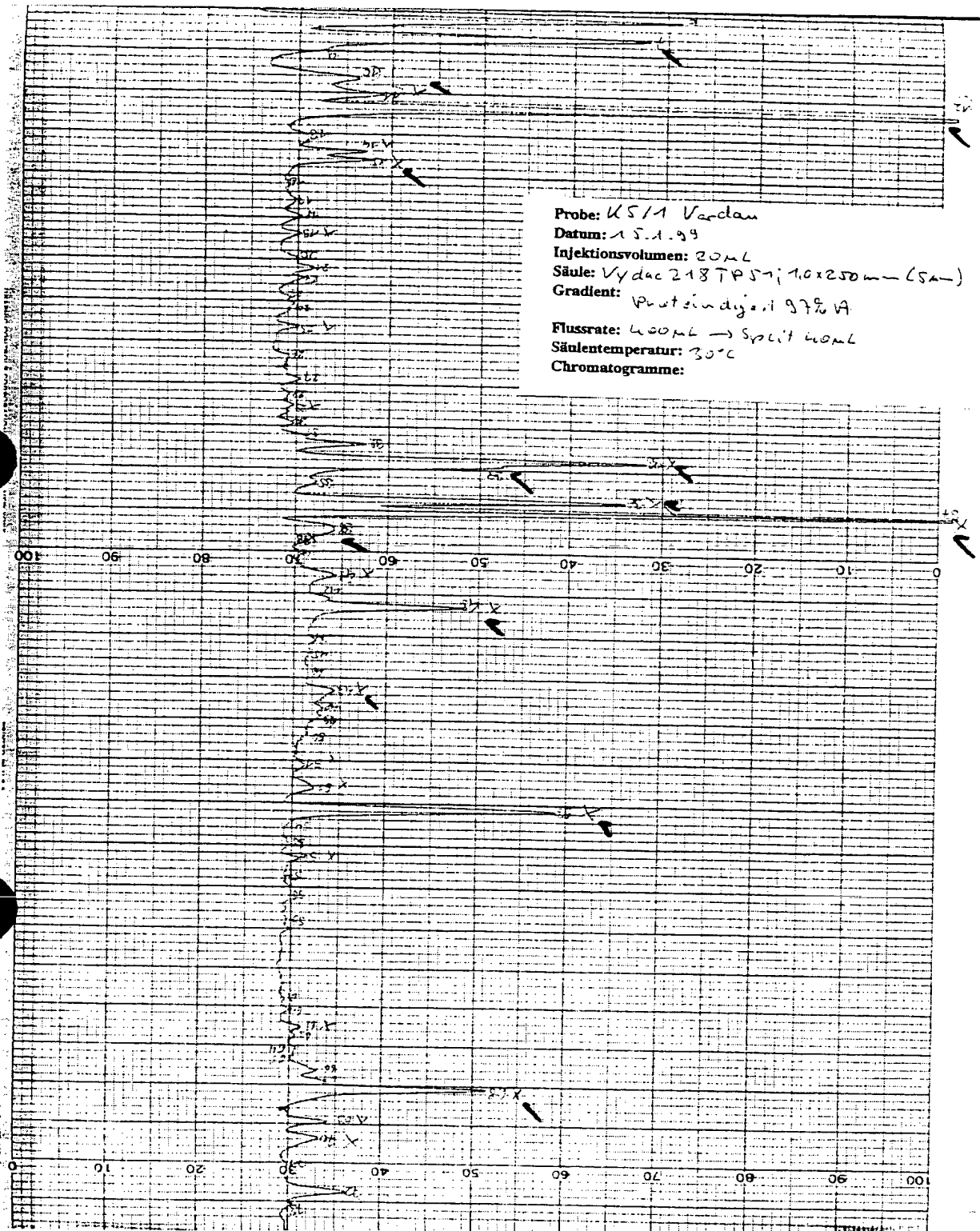


Abbildung 2. Chromatographische Trennung nach enzymatischer Fragmentierung.

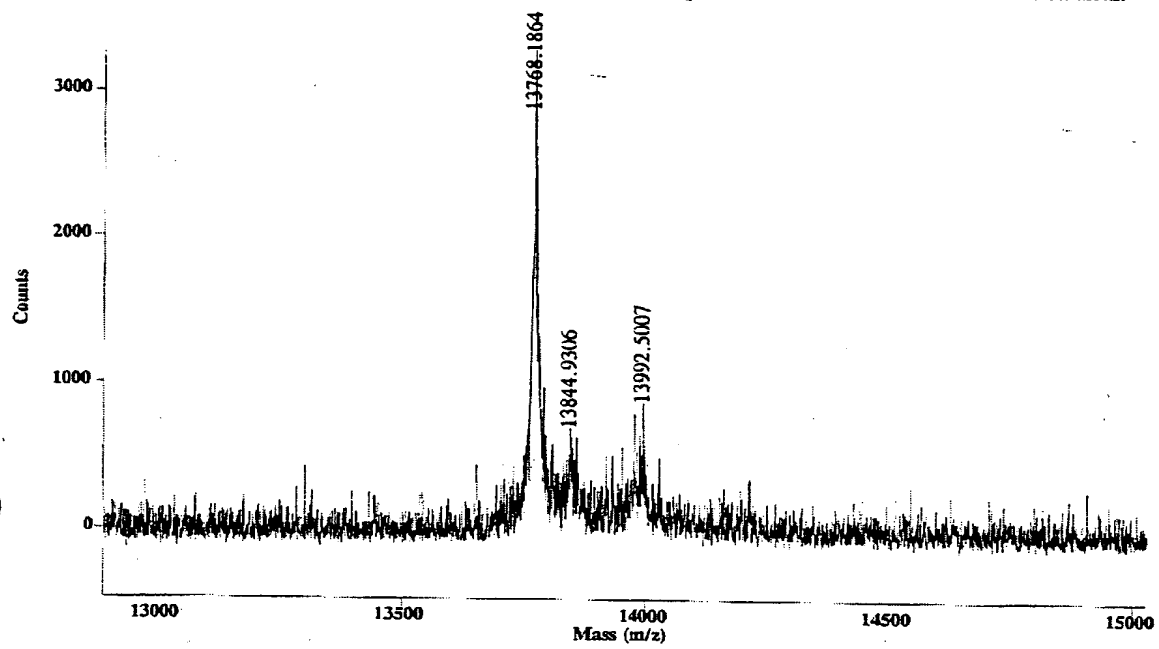


Abbildung 3. Massenspektrum der Histidin Protein-Phosphatase.